

·基础研究·

氦氖激光对兔退变颞下颌关节髁突软骨基质表达的影响*

毛凯平¹ 邹璟¹ 李解¹ 姜梦雅¹ 高桃珍¹

摘要

目的:通过研究氦氖激光对退变颞下颌关节髁突软骨细胞外基质基质胶原2(Col-2)、蛋白多糖4(PRG-4)表达的影响,明确氦氖激光对颞下颌关节退变的保护作用与机制,为临床运用氦氖激光治疗颞下颌关节骨关节病提供依据。

方法:将骨骼发育成熟的健康成年雄性新西兰大白兔随机分为正常组、假模型组、模型组和干预组,每组10只,组内又分为造模后第1天、第11天两个取材时间点。参照常嘉等的造模方法,建立颞下颌关节骨关节病动物模型并行CT检查证实造模成功后纳入。干预组采用氦氖激光照射患侧颊车、上关、下关、听宫、翳风穴,5min/穴/d,共10d;假模型组仅作关节囊切开后即缝合组织。各组于不同时间点取出颞下颌关节组织,采用HE染色观察干预前后形态学改变;Western Blot方法检测Col-2、PRG-4的表达水平。

结果:退变髁突软骨HE染色可见纤维降解,增殖层及过度层细胞排列紊乱,细胞核出现皱缩,核浓染,经过氦氖激光治疗后的髁突软骨纤维层轻度松解,部分纤维合成,红染增强。Western Blot检测发现正常组及假模型组不同时间点之间Col-2、PRG-4蛋白表达差异无显著性意义;模型组第11天各细胞外基质蛋白表达明显降低;氦氖激光干预10天后各细胞外基质蛋白的表达明显增加。

结论:氦氖激光干预可上调退变颞下颌关节软骨细胞外基质Col-2、PRG-4蛋白表达,纠正细胞外基质降解,从而防治颞下颌关节骨关节病。

关键词 氦氖激光;颞下颌关节退变;基质胶原2;蛋白多糖4

中图分类号:R782.6, R730.57 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-1242(2017)-09-0984-05

Effects of He-Ne laser on expression of extracellular matrix in degenerated temporomandibular joint of rabbit/ MAO Kaiping, ZOU Jing, LI Jie, et al./Chinese Journal of Rehabilitation Medicine, 2017, 32(9): 984—988

Abstract

Objective: To observe effects of He-Ne laser on the expression of Col-2 and PRG-4 in degenerated temporomandibular joint of rabbit, and to explore its protective role and mechanism in relieving temporomandibular joint degeneration and provide the basis for clinical application of He Ne laser in the treatment of temporomandibular joint osteoarthritis.

Method: Forty New Zealand white rabbits were randomly divided into 4 groups: normal group, sham model group, model group and treatment group, 10 in each group, every group was divided into two time points (1d, 11d). Establish animal model of temporomandibular joint disease consulting the building methods of Changjia. He-Ne laser was rayed at Jiache, Shangguan, Xiaguan, Tinggong, Yifeng point for 10 days in the treatment group. Stitch joint capsule as soon as its incision in sham model group. The animals were killed at day 1 and day 11 and HE staining was used to observe the morphological changes after treatment, the protein expression of extracellular matrix in temporomandibular joints were examined with Western Blot.

DOI:10.3969/j.issn.1001-1242.2017.09.003

*基金项目:武汉市卫生科研项目(WX14C03)

1 武汉市第一医院口腔科,武汉,430022

作者简介:毛凯平,女,硕士,主治医师;收稿日期:2016-05-26

Result: Degenerative condylar cartilage HE staining showed dyed fibers degradation, cells in proliferation and excessive layer arranged disorder, the nucleus in shrinking and hyperchromatic. After He-Ne laser treatment, the fibers in fiber layer of condylar cartilage mild soluted, part of the fibers composite and stained red. Col-2, PRG-4 protein expression had no statistical significance between different time point in the normal group and the sham model group by Western Blot test, but protein in extracellular matrix were up-regulated in the treatment group after 10 days He-Ne laser treatment.

Conclusion: He-Ne laser on acupoints may protect temporomandibular joint from degeneration of protein in extracellular matrix through up-regulating the expression of Col-2, PRG-4.

Author's address Department of Stomatology, Wuhan First Hospital, Wuhan, 430022

Key word He-Ne laser; temporomandibular joint; collagen-2; proteoglycan-4

颞下颌关节骨关节炎(temporomandibular joint osteoarthritis, TMJOA)是指颞下颌关节组织发生磨损与变形,并在关节表面形成新骨的非炎症性骨关节炎。由于颞下颌关节结构与功能复杂,加之人的一生中牙合型不断发生改变,颞下颌关节经历了复杂的改建过程,以致其发病率高达30%,严重影响患者的生存质量^[1]。

研究证实,细胞外基质(extracellular matrix, ECM)成分改变是关节软骨退行性改变的重要原因。氦氖激光是临床治疗TMJOA的常用手段之一,但其作用机制尚不完全清楚,本文通过研究氦氖激光对退变颞下颌关节细胞外基质胶原2(collagen-2, Col-2)、蛋白多糖4(proteoglycan-4, PRG-4)表达的影响,以期明确氦氖激光对颞下颌关节退变的保护作用与机制,为临床运用氦氖激光治疗颞下颌关节骨关节炎提供依据。

1 材料与方法

1.1 动物与分组

选用骨骼发育成熟的健康成年雄性新西兰大白兔,月龄5—6m,体重2—2.5kg,无牙颌畸形,由武汉大学实验动物中心提供(合格证号42000500002225),在标准条件下(武汉市第一医院中心实验室)适应性饲养3周后开始实验,实验过程中的程序经过了武汉市第一医院实验动物伦理委员会审批。所有动物进行编号,查随机数字表分为4组:①正常组(n=10):自然饲养,不作任何治疗。②模型组(n=10):模型,不作任何治疗。③假模型组(n=10):同模型组,但不切除关节盘,不作任何治疗。④干预组(n=10):于造模后第1天开始氦氖

光治疗,连续治疗10d。

各组分别在造模后第1天,将各组10只新西兰兔予以麻醉后行CT检查模型是否成功,出现骨关节炎(osteoarthritis, OA)改变的动物予以纳入模型组和干预组,每组5只,待苏醒后继续激光治疗10d。在第1天和第11天两个时间点各取5只,将实验动物以过量注射麻醉药方法处死,取各组髁突,一部分放入4%多聚甲醛供HE染色,一部分直接冻存于-80℃冰箱待检测。

1.2 造模方法

参照常嘉等^[2]的造模方法,建立颞下颌关节骨关节炎动物模型。于耳缘静脉注射1mg/kg的2.5g/L的戊巴比妥钠。无菌条件下自眼外眦外侧5mm处至外耳道方向行2cm长的皮肤切口,分离皮下组织,暴露关节囊。水平切开关节囊,切开关节盘的外侧附着,将下颌升支推向外侧以充分暴露髁突关节面与关节盘。将关节盘前外1/2部分切除。无菌生理盐水充分冲洗后将剩余关节盘复位,分层缝合关节囊、皮下组织和皮肤。假模型组仅作关节囊切开后即缝合组织。术后不限制动物的下颌运动,饲养颗粒性常规兔饲料,单笼饲养。连续肌肉注射青霉素3天,每天4万单位。于术后1个月行颞下颌关节CT检查,出现典型的TMJOA改变即进行后续实验,未出现TMJOA改变的动物予以剔除。

1.3 治疗方法

上海曼迪森科贸有限公司生产的MDC-500半导体激光治疗仪(MDC-500),剂量参照Suri S等^[3]运用激光治疗颞下颌关节紊乱病的参数,输出氦氖激光波长632.8nm,功率10mW,激光光针光斑直径2mm。按照《实验针灸学》教材进行动物穴位定位,

取患侧以下穴位:颊车(下颌角前上方咬肌最丰隆处中点);上关(在耳前,当颧弓的上缘凹陷处);下关(在面部,在颧骨下缘中央与下颌切迹之间的凹陷中);听宫(耳屏切迹正下方,开口凹处向后);翳风(乳突尖至下颌升支后缘垂线之中点),光针紧贴皮肤并与之垂直,每穴照射5min,共治疗10d。

1.4 取材及Western Blot检测

取出软骨后,迅速称重,然后将组织放入装有液氮的研钵中,利用研磨法将软骨磨成粉末状,收集到1.5mL的EP管中,在冰上裂解组织30min,离心15min,取上清,测定蛋白浓度。Western Blot方法进行检测Col-2、PRG-4蛋白表达量:按蛋白分子量配制10%的PAGE胶电泳,根据预染剪与PAGE凝胶相同大小的PVDF膜和滤纸,PVDF膜用甲醇浸泡数秒后和滤纸一同浸泡于电转缓冲液中。然后用含5%脱脂奶粉的TBST(封闭液)浸泡PVDF膜,室温摇床封闭2h。再加入一抗孵育,TBST充分洗涤PVDF膜5—6次,用封闭液稀释相应的HRP标记二抗1:40000稀释,使PVDF膜浸泡于二抗孵育液中,显色曝光。BandScan凝胶图像分析软件分析胶片灰度值。

1.5 统计学分析

采用SPSS 17.0软件进行,各组检测阳性细胞值用均数±标准差表示,组间、组内比较采用双因素方差分析。

2 结果

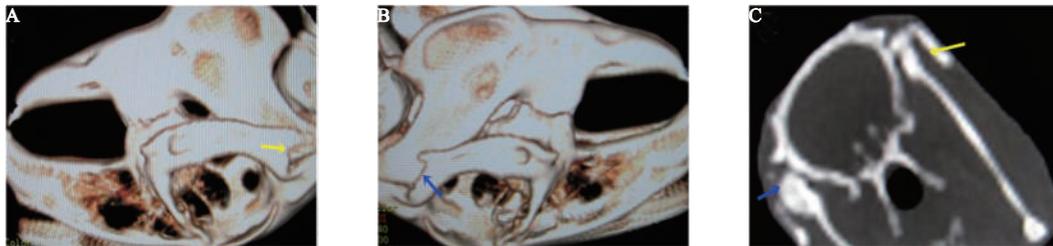
2.1 模型兔颞下颌关节CT表现

本研究采用了成年新西兰大白兔作为实验对象,手术切除部分关节盘制造TMJOA模型。模型兔于术后1个月行三维CT检查,患侧下颌关节盘出现缺损,形态改变,骨质表面粗糙,CT平扫可见骨赘及关节结节形成,骨质增生明显。见图1。

2.2 髁突软骨HE染色

正常髁突软骨分为纤维层、增殖层、过度层及软骨层,HE染色发现假模型组与正常组基本无变化,退变髁突软骨纤维层可见纤维降解,增殖层及过度层细胞排列紊乱,细胞数量较正常减少,纤维层与软骨层之间距离变小,细胞核出现皱缩,核浓染,另外一些细胞甚至核仁的完全消失,软骨陷窝增大,留下白色细胞影态。经过氩氛激光治疗10天后的软骨髁突较模型组相比,纤维层轻度松解,部分纤维合成,红染增强。见图2。

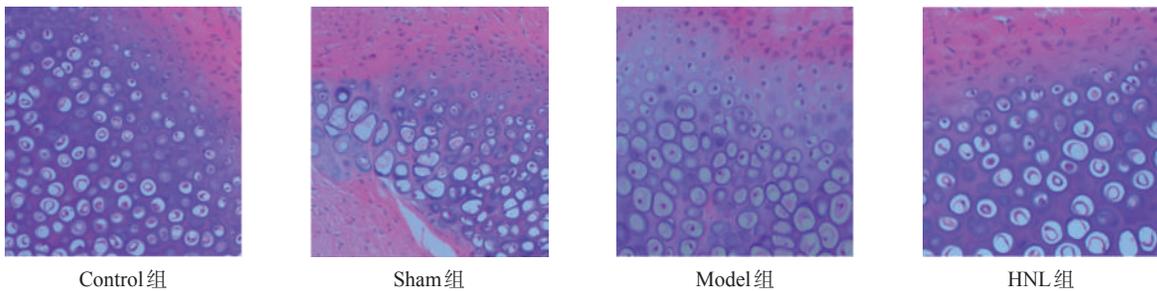
图1 模型兔颞下颌关节CT表现



A和B分别为模型组健侧(左侧)、患侧(右侧)颞下颌关节三维CT表现,图C为CT平扫。黄色箭头标示为健侧(左侧),蓝色箭头标示为患侧(右侧),可见患侧骨质表面粗糙,骨赘及关节结节形成,骨质增生明显。

图2 兔髁突软骨

(HE染色,×200)



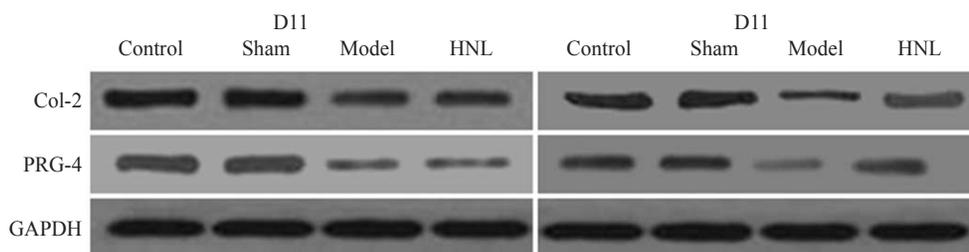
正常髁突软骨分为纤维层、增殖层、过度层及软骨层。细胞核被染成蓝色,软骨基质呈深蓝色,细胞浆被伊红染成深浅不同的粉红色至桃红色,胶原纤维呈淡粉红色。Control、Sham、Model及HNL分别代表正常组、假模型组、模型组及氩氛激光干预组。

2.3 氩氦激光治疗对细胞外基质表达的影响

Western Blot 检测显示,正常组和假模型组各时间点 Col-2、PRG-4 蛋白表达均无显著性变化;造

模成功后第 1 天时间点,模型组与干预组两基质蛋白表达均明显减少,经过氩氦激光治疗 10 天后,两种基质蛋白表达均有不同程度上升。见图 3。

图3 各组不同时间点 COL-2、PRG-4 蛋白表达



Control、Sham、Model 及 HNL 分别代表正常组、假模型组、模型组及氩氦激光干预组。

3 讨论

颞下颌关节骨关节炎的发生与髁突软骨退行性改变密切相关,软骨基质的合成与分解代谢调控失衡被认为是主要病理环节^[4],其特点是关节软骨基质降解,软骨细胞增生减少,导致关节软骨组织破坏。诸多国内外临床试验研究^[5-7]表明,氩氦激光对颞下颌骨关节病具有良好的治疗作用。我们通过关节盘切除方法建立 TMJOA 模型,探讨氩氦激光治疗本病的可能机制,发现退变的颞下颌关节组织中,软骨基质 Col-2、PRG-4 蛋白表达较正常颞下颌关节明显降低,氩氦激光照射患侧颊车、上关、下关、听宫、翳风穴 10 天后,颞下颌关节组织中 Col-2、PRG-4 蛋白表达明显增加,表明氩氦激光治疗可上调退变颞下颌关节细胞外基质 Col-2、PRG-4 蛋白表达,纠正细胞外基质降解,从而防治颞下颌关节骨关节炎。Col-2 是髁突软骨的主要结构成分,是形成细胞外软骨生物机械的重要支架,是胶原分子相互作用的关键,为软骨分化的主要特异性蛋白^[8]。PRG-4 是一种蛋白多糖,是关节液的重要组成部分,可介导边界润滑^[9-11],缓冲过大的关节负荷,降低盘突间的摩擦力,保护和修复软骨。而由于关节软骨没有神经和血管。髁突软骨分为不同的层次,HE 染色发现假模型组与正常组形态基本无变化,模型组中,退变髁突软骨纤维降解,增殖层及过度层细胞排列紊乱,纤维层与软骨层之间距离变小,细胞核出现皱缩,核浓染。经过氩氦激光治疗 10 天后的软骨髁突较模型组相比,纤维层轻度松解,部分纤维合成,HE 可见红

染增强。进而我们又通过测定 Col-2 及 PRG-4 的蛋白含量证实激光的治疗作用。有趣的发现是氩氦激光照射 10 天后的 Col-2 蛋白表达与正常组含量无明显差异,而 PRG-4 较模型组升高的同时,其蛋白表达明显低于正常组,考虑形成这一结果的原因可能是由于胶原纤维和蛋白多糖在软骨基质不同层次的表达不一样,激光治疗后可明显促进软骨合成代谢的增加,同时软骨出现代偿性增生,但此时软骨基质中相对蛋白多糖的含量已明显减少,分解代谢仍然存在,该结果与形态学的发现类似,有研究也显示^[12-14],OA 的早期软骨细胞分泌的蛋白多糖多为幼稚型,其核心蛋白的结构和氨基多糖链的长度均异于正常,氨基多糖各组分的比例也发生改变,这种蛋白多糖极易变性降解。

氩氦激光进行穴位照射治疗本病具有无痛、不损伤皮肤组织的特点,无传播血源性传染病的风险,也不会引发机体感染,更容易被患病者接受,因此既往对于本病的研究多集中在临床试验及样本观察方面,少有涉及实验研究,有部分临床试验从缓解疼痛的角度,发现激光治疗通过促进新生血管的形成改善 TMJDS 患者局部血液循环,通过抑制固有炎症介质 PGE 的合成及直接抗炎作用降低炎症反应^[15],通过改善肌组织缺氧和调节 pH 减少疼痛性刺激^[16]。本研究将针灸学、影像学及形态学相结合,探讨其氩氦激光治疗本病的分子机制,为临床运用氩氦激光治疗 TMJOA 提供了一定的理论依据。

颞下颌关节紊乱主要的临床表现为局部疼痛伴

有关节活动障碍,本课题为应用基础研究,未能涉及与临床相关的指标,如疼痛阈值的观察。另外,氩氦激光直接或间接作用于神经、肌肉和腺体等可以产生兴奋作用,尚无明确的靶点,本研究只从细胞外基质水平探讨氩氦激光防治下颌关节紊乱的机制,我们认为神经—内分泌调节扮演了重要角色,但具体的细胞内及信号转导通路有待进一步研究。

参考文献

- [1] 方泽强,马绪臣.颞下颌关节骨关节病髁突软骨细胞线粒体DNA突变的实验研究[J].北京大学学报(医学版),2006,38(3):293—297.
- [2] 常嘉,马绪臣,武登诚,等.颞下颌关节骨关节病动物模型的建立及组织病理学观察[J].现代口腔医学杂志,2003,17(6):485—488.
- [3] Suri S. Design features and simple methods of incorporating nasal stents in presurgical nasoalveolar molding appliances [J]. J Craniofac Surg, 2009, 20(Suppl 2):1889—1894.
- [4] 常嘉,马绪臣,马大龙.兔实验性骨关节病髁突软骨细胞表达软骨基质分子的变化及白细胞介素1 β 的影响[J].北京大学学报(医学版),2003,35(5):521—524.
- [5] 方贤浩,李荣,申栽贤,等.半导体激光治疗颞下颌关节功能紊乱综合征[J].中国激光医学杂志,2001,10(2):184.
- [6] Fikácková H, Dostálová T, Navrátil L, et al. Effectiveness of low-level laser therapy in temporomandibular joint disorders: a placebo-controlled study[J]. Photomed Laser Surg, 2007, 25(4):297—303.
- [7] Mazzetto MO, Carrasco TG, Bidinelo EF, et al. Low intensity laser application in temporomandibular disorders: a phase I double-blind study[J]. Cranio, 2007, 25(3):186—192.
- [8] 夏欣一,杨滨.COL2A1基因突变于II型胶原病[J].中国优生与遗传杂志,2008,16(7):3—8.
- [9] 冯剑颖,谷志远,林新平,等.兔关节盘前移位后髁突软骨PRG4 mRNA表达改变的研究[J].口腔医学,2010,30(6):324—327.
- [10] 魏红,程杰,王子露,等.rhIL-1 α /rhTGF- β 1诱导下大鼠髁突软骨细胞PRG4的表达[J].实用口腔医学杂志,2010,26(6):735—738.
- [11] Kim HK, Moran ME, Salter RB. The potential for regeneration of articular cartilage in defects created by chondral shaving and subchondral abrasion. An experimental investigation in rabbits[J]. J Bone Joint Surg Am, 1991, 73(9):1301—1315.
- [12] Dijkgraaf LC, de Bont LG, Boering G, et al. Normal cartilage structure, biochemistry, and metabolism: a review of the literature[J]. J Oral Maxillofac Surg, 1995, 53(8):924—929.
- [13] Bleasel JF, Poole AR, Heinegård D, et al. Changes in serum cartilage marker levels indicate altered cartilage metabolism in families with the osteoarthritis-related type II collagen gene COL2A1 mutation[J]. Arthritis Rheum, 1999, 42(1):39—45.
- [14] 卫晓恩,杨庆铭,邓廉夫,等.骨关节炎软骨基质蛋白多糖变化的实验研究[J].中华风湿病学杂志,2002,6(1):25—27.
- [15] Sakurai Y, Yamaguchi M, Abiko Y. Inhibitory effect of low-level laser irradiation on LPS-stimulated prostaglandin E2 production and cyclooxygenase-2 in human gingival fibroblasts[J]. Eur J Oral Sci, 2000, 108(1):29—34.
- [16] Von Korff M, Jensen MP, Karoly P. Assessing global pain severity by self-report in clinical and health services research[J]. Spine (Phila Pa 1976), 2000, 25(24):3140—3151.